

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-178596

(43)Date of publication of application : 06.07.1999

(51)Int.Cl.

C12Q 1/04
C12M 1/34

(21)Application number : 09-355778

(71)Applicant : NITTO DENKO CORP
WAKO PURE CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 24.12.1997

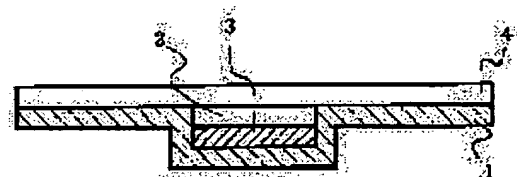
(72)Inventor : SAIGA TAKESHI
SENDA SHUJI
TSUCHIYA MASAKAZU
NASU MASAO
TANI KATSU HARU

(54) SHEET-LIKE ARTICLE FOR DETECTING MICROORGANISM, KIT CONTAINING THE SAME AND USED FOR DETECTING MICROORGANISM AND DETECTION OF MICROORGANISM WITH THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject sheet-like article capable of highly sensitively and precisely detecting microorganisms by forming a microorganism-free depression, holding a detection reagent in the depression and bonding releasable sheet so as to close the depression.

SOLUTION: This sheet-like article 1 for detecting a microorganism is obtained by holding a detection reagent 3 in a substantially microorganism-free depression 2 of a sheet-like article and subsequently sealing a separator 4 comprising a releasable sheet so as to close the depression 2. The depression 2 of the sheet-like article 1 is formed by subjecting the sheet-like article to an embossing treatment or a blistering treatment. The detection reagent 3 comprises a reagent reacting with either of an endotoxin, a peptide glucan or β -1,3-glucan to develop a color, emit fluorescent light or the like. The sheet-like article 1 can highly sensitively and highly precisely detect or measure microorganisms, enables the simple and real-time examinations, etc., of the microorganisms without culturing the microorganism, and is useful for the examination of environments at sites for medical treatments, foods, etc.



[Date of request for examination]

12.10.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-178596

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月6日

(51) Int. CL⁸

識別記号

P 1

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 M 1/34

C 1 2 M 1/34

B

D

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平9-355778

(22) 出願日 平成9年(1997)12月24日

(71) 出願人 000003964

日東電工株式会社

大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号

(71) 出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72) 発明者 藤賀 健

大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東
電工株式会社内

(72) 発明者 千田 修治

大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東
電工株式会社内

(74) 代理人 弁理士 高島 一

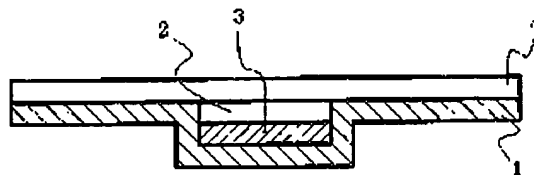
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物検出用シート状物、それを含む微生物検出キットおよびそれを用いた微生物検出方法

(57) 【要約】

【課題】 細菌などの微生物の検出や計測において、リアルタイムでのモニタリングが可能となるような微生物検出用シート状物、それを含む微生物検出キットおよびそれを用いた微生物検出方法に関する。

【解決手段】 実質的に微生物フリーの凹部が設けられたシート状物であって、当該凹部を密閉するように剥離可能なシートが当該シート状物に接着され、かつ当該凹部に検出用試薬が保持されてなることを特徴とする微生物検出用シート状物。



- 1 検出用シート状物
- 2 凹部
- 3 検出用試薬
- 4 セパレーター

【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に微生物フリーの凹部が設けられたシート状物であって、当該凹部を密閉するように剥離可能なシートが当該シート状物に接着され、かつ当該凹部に検出用試薬が保持されてなることを特徴とする微生物検出用シート状物。

【請求項2】 検出用試薬が、発色試薬、蛍光試薬または発光試薬である請求項1に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項3】 検出用試薬が、節足動物の体液由来の物質を含んでなる請求項1に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項4】 節足動物が、昆虫またはカブトガニである請求項3に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項5】 検出用試薬が、エンドトキシン、ペプチドグリカンおよび β -1, 3-グルカンのいずれかと反応して発色、発光または発光する試薬である請求項1に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項6】 発色試薬が、酵素前駆体および発色性基質を含んでなる請求項2に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項7】 酵素前駆体が、昆虫の体液由来のプロフェノール酸化酵素カスケードの不活性型因子である請求項6に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項8】 少なくとも凹部の形成部分が透明または半透明である請求項1に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項9】 少なくとも凹部の形成部分が水蒸気不透過性である請求項1または8に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項10】 凹部が、シート部材に対するエンボス加工またはプリスター加工によって形成されてなるものである請求項1に記載の微生物検出用シート状物。

【請求項11】 請求項1～10のいずれかに記載の微生物検出用シート状物と、支持体と粘着層とが積層された微生物捕集用粘着シートとを含んでなることを特徴とする微生物検出キット。

【請求項12】 さらに、容器に密封封入された、検出用試薬を溶解し得る溶解液を含む請求項11に記載の微生物検出キット。

【請求項13】 粘着シートの粘着面の水濡れ接触角が 90° 以下である請求項11に記載の微生物検出キット。

【請求項14】 粘着シートが透明または半透明である請求項11に記載の微生物検出キット。

【請求項15】 請求項1～10のいずれかに記載の微生物検出用シート状物に接着された剥離可能なシートを剥離し、凹部に検出用試薬を溶解し得る溶解液を添加して検出用試液を調製し、検査対象物を当該検出用試液と接触させ、当該検出用試液の変化の有無を観察すること

を特徴とする微生物検出方法。

【請求項16】 検査対象物が、被検物表面に粘着シートの粘着面を接触させて転写・捕集したものであることを特徴とする請求項15に記載の微生物検出方法。

【請求項17】 粘着シートの粘着面を検出用試液を保持した凹部を覆うように接着させた後、当該粘着面と検出用試液とを接触させることを特徴とする請求項16に記載の微生物検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検物の表面上の微生物を検出し、あるいはその数を計測するための微生物検出用シート状物、それを含む微生物検出キットおよびそれを用いた微生物検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、被検物表面に存在する、肉眼では観察することのできない細菌等の微生物を観察するには、一個の微生物からコロニーを形成する微生物の培養法が応用されている。即ち、寒天等で賦形した固形の平板培地を被検物表面に押し当てることにより、被検物表面上の微生物を寒天平板培地上に転写した後、そのまま微生物を至適環境下で培養し、寒天平板培地上に生育したコロニーを肉眼で見定めながら計測する。例えば、日水製薬（株）が販売するアガースタンプを使用したフードスタンプ法等がある。

【0003】また、微生物捕集能力のある市販のメンブレンフィルタ等を用いるメンブレンフィルタ法は、被検物表面を生理食塩水やリン酸緩衝液等を用いて十分拭き取りながら集積することにより微生物を洗い出し、この洗い出した集積水溶液をメンブレンフィルタ等で透過することによって、メンブレンフィルタ上に微生物を捕集し、集積した後、微生物と液体培地とを十分に接触させてフィルタ上にコロニーを形成させ、これを計測する方法である。

【0004】さらに、医学検査、第41巻、第3号、p 352（1992）には、フィルム上に培地をコートしたフィルムコート培地を作製し、これを被検物表面に接触させた後、培養することにより、検出対象の微生物を採取するフィルムコート法が培養法の例として報告されている。

【0005】しかしながら、フードスタンプ法等では、被検物表面に押しつけて表面上の微生物を転写する際に、粘着力が弱いために転写・捕集効率が低く、また寒天培地の含水率によって捕集効率が変化し、再現性に劣る等、微生物の捕集効率において不都合を来すことが多かった。また、培養法の共通の課題として、培地上での微生物間の相互作用により純粋培養ができないために、その後の同定判定に不都合を来すことが多かった。加えて、培養法では当然のことながら、培地で適度に生育しコロニーを形成できる微生物が限定され、通常の培地で

は培養できない微生物もあり、しかも生菌のみの検出に限定されるという制約があり、検出もれが起こるという大きな問題があった。そして重大な制約として、培養法では、1～2日またはそれ以上の培養時間を必要とするので、リアルタイムでの微生物検出モニタリングが不可能なことが挙げられる。

【0006】また、メンブレンフィルタ法では、水溶液等の液状の被検物であればそのまま通過できるが、水溶液以外の非液状の被検物では、綿棒でのサンプリング、洗い出し液の調製等を含め微生物の集積に多大な労力がかかる。しかも、フィルタ上での培養により、コロニーを形成させてカウントするので、上記の培養法の欠点をそのまま引き継ぐことになる。さらに、フィルムコート法も培養法のひとつとしての諸欠点を有する。

【0007】最近では、微生物細胞内のATP（アデノシン三リン酸）を検出する技術が開発されているが、これも水に分散した微生物に対象が限られており、やはり集菌法がネックとなっていた。以上のように、簡便な微生物の試験方法が従来技術では考えられていなかったのが現状である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記従来法の諸欠点を解消することを目的とするもので、その目的は、細菌等の微生物の検出や計測において、リアルタイムでのモニタリングが可能となるような微生物検出用シート状物、それを含む微生物検出キットおよびそれを用いた微生物検出方法に関する。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、以下の特徴を有する。

(1) 実質的に微生物フリーの凹部が設けられたシート状物であって、当該凹部を密閉するように剥離可能なシートが当該シート状物に接着され、かつ当該凹部に検出用試薬が保持されてなることを特徴とする微生物検出用シート状物。

(2) 検出用試薬が、発色試薬、蛍光試薬または発光試薬である上記(1)に記載の微生物検出用シート状物。

(3) 検出用試薬が、節足動物の体液由来の物質を含んでなる上記(1)に記載の微生物検出用シート状物。

(4) 節足動物が、昆虫またはカブトガニである上記(3)に記載の微生物検出用シート状物。

(5) 検出用試薬が、エンドトキシン、ペプチドグリカンおよびβ-1, 3-グルカンのいずれかと反応して発色、発光または発光する試薬である上記(1)に記載の微生物検出用シート状物。

(6) 発色試薬が、酵素前駆体および発色性基質を含んでなる上記(2)に記載の微生物検出用シート状物。

(7) 酵素前駆体が、昆虫の体液由来のプロフェノール酸化酵素カスケードの不活性化因子である上記(6)に記載の微生物検出用シート状物。

(8) 少なくとも凹部の形成部分が透明または半透明である上記(1)に記載の微生物検出用シート状物。

(9) 少なくとも凹部の形成部分が水蒸気不透過性である上記(1)または(8)に記載の微生物検出用シート状物。

(10)凹部が、シート部材に対するエンボス加工またはブリスト加工によって形成されてなるものである上記(1)に記載の微生物検出用シート状物。

(11)上記(1)～(10)のいずれかに記載の微生物検出用シート状物と、支持体と粘着層とが積層された微生物検出用粘着シートとを含んでなることを特徴とする微生物検出キット。

(12)さらに、容器に密封封入された、検出用試薬を溶解し得る溶解液を含む上記

(11)に記載の微生物検出キット。

(13)粘着シートの粘着面の水濡れ接触角が90°以下である上記(11)に記載の微生物検出キット。

(14)粘着シートが透明または半透明である上記(11)に記載の微生物検出キット。

(15)上記(1)～(10)のいずれかに記載の微生物検出用シート状物に接着された剥離可能なシートを剥離し、凹部に検出用試薬を溶解し得る溶解液を添加して検出用試薬を調製し、検査対象物を当該検出用試薬と接触させ、当該検出用試薬の変化の有無を観察することを特徴とする微生物検出方法。

(16)検査対象物が、被検物表面に粘着シートの粘着面を接触させて転写・積層したものである上記(15)に記載の微生物検出方法。

(17)粘着シートの粘着面を検出用試薬を保持した凹部を覆うように接着させた後、当該粘着面と検出用試薬とを接触させる上記(16)に記載の微生物検出方法。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を図面に基づいて説明する。例えば、図1～4に示されるように、本発明の微生物検出用シート状物1には実質的に微生物フリーの凹部2が設けられており、その凹部2を密閉するように剥離可能なシート4が接着されている。この検出用シート状物1は、検査対象物と検出用試薬との間の反応により生じる発色等の変化を観察することができるよう、例えば図2、4で示されるように、検出用シート状物1の少なくとも凹部2の形成部分(A)は透明または半透明であることが好ましい。また、凹部2に保持される検出用試薬3は一様に水滴の存在下や高湿度環境においてその活性を消失しやういため、その長期保存安定性を確保すべく、検出用シート状物1の少なくとも凹部2の形成部分は水蒸気不透過性であることが好ましい。

【0011】なお、本発明において、透明または半透明とは、検査対象物と検出用試薬との間の反応により生じる発色等の変化の度合や有無を観察できる程度に透明であることをいう。透明または半透明でない場合、この変化の度合や有無を検出用シート状物1側から観察するこ

とができない。また、本発明において、水蒸気不透過性とは、水蒸気透過度が $50\text{ g/m}^2 \cdot 24\text{ hr}$ 以下、好ましくは $5\text{ g/m}^2 \cdot 24\text{ hr}$ 以下であることをいう。水蒸気不透過性でない場合、凹部2に保持される検出用試薬3は一般に水滴の存在下や高湿度環境においてその活性を消失しやすく、その長期保存安定性を確保できない。

【0012】検出用シート状物1の材質は上記の特性を満足するものであれば特に限定されない。例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリ塩化ビニル等からなるプラスチックシートやガラス等が使用される。

【0013】検出用シート状物1が図1、2に示されるような形状の場合、材質がガラスであれば熔融成形で、プラスチックであればシート部材をエンボス加工またはブリスト加工により作成される。

【0014】検出用シート状物1が図3、4に示されるような形状、即ち、当該シート状物1の凹部が設けられていない側面が平面であるような形状であってもよい。この場合、材質がガラスであれば熔融成形で、プラスチックであれば切削や熔融成形等により作成される。

【0015】また、凹部2の材質とその他の部分の材質とが異なってもよい。さらに、検査対象物を、後述するような粘着テープのような粘着性を有するものによって転写・捕集する以外の場合には、少なくとも凹部2の周囲の密着面側（剥離可能なシート4が接着している面側）は粘着性を有していることが好ましい。検出用シート状物1の厚みは（凹部2の形成部分も含めて）、好ましくは $10 \sim 1000\text{ }\mu\text{m}$ である。

【0016】凹部2は複数個設けられていてもよい。また凹部2の密着面側の断面形状は、特に限定されず、円形であっても、多角形であってもよい。その断面の大きさは特に制限はないが、例えば、検査対象物を粘着面に転写・捕集した粘着シートを凹部2を密封するように密着させて検査を行う場合には、少なくとも当該粘着シートよりも小さく設計される。即ち、例えば、検査対象物が、後述するような被検物表面に付着した微生物であって、これを粘着面に転写・捕集した粘着シートで凹部2を密封することにより検出を行う場合、凹部2の密着面側の断面形状が円形である時は、例えば、凹部2の直径が 10 mm 径に設計するならば、粘着シートは少なくとも 15 mm 直径の円を含むことができる大きさ（面積）を、好ましくは 20 mm 直径の円を含むことのできる大きさ（面積）を確保して、凹部2を覆って十分余りあるように設計されることが好ましい。

【0017】また凹部2の深さは $0.02 \sim 4\text{ mm}$ の範囲、好ましくは $0.05 \sim 1\text{ mm}$ の範囲で設定するのがよい。 0.02 mm 未満の深さでは、例えば発色の判定が難しくなり、また 4 mm 以上の深さでは凹部2を満たすべき溶解液の量が多くなりすぎて好ましくない。

【0018】検出用試薬3はこの凹部2に予め保持されている。この検出用試薬3は、検査対象物である微生物を検出するための試薬であり、一回の検出反応に必要な量が保持され、好ましくは固形微粒子状のものが使用される。検出用試薬3が固形微粒子状のものである場合、通常はこれに溶解液を添加して検出用試液としてから検査対象物との反応（検出試験）に供される。検出用試薬3が2種以上の物質からなる場合（例えば、後述するような酵素前駆体と発色性基質を含んでなる発色試薬である場合）は、互いに直接接触しないように隔離して凹部2に保持されていることが好ましい。

【0019】本発明においては、検出用試薬3中に、検出試験の際に必要な試薬類を全て含有させておかなくともよい。例えば、検出を発色試薬を用いて行う場合であって、発色試薬が酵素前駆体と発色性基質とを含んでなる場合、当該酵素前駆体と発色性基質とを検出用試薬3中に含有させておく必要はなく、酵素前駆体と発色性基質の何れかを検出用試薬3中に含有させておき、他方を検出用試薬3の溶解液中に含有させておいてもよい。また、検査対象物が、後述するような、被検物表面に付着した微生物であって、これを粘着シートで転写・捕集する場合、当該粘着シートの粘着層表面あるいは粘着層中に発色性基質を含ませておき、酵素前駆体を検出用試薬3中に含有させるようにしてもよい。

【0020】また、検出用シート状物1は、図1～4に示されるように、少なくとも凹部2が剥離可能なシート4（以下、セパレーター4という。）により密封されている。セパレーター4としてはフィルムまたは金属箔が使用される。検出用試薬3は一般に水滴の存在下や高湿度環境においてその活性を消失しやすく、その長期保存安定性を確保するために、セパレーター4は水蒸気不透過性であることが好ましい。ここで、水蒸気不透過性とは、水蒸気透過度が $50\text{ g/m}^2 \cdot 24\text{ hr}$ 以下、好ましくは $5\text{ g/m}^2 \cdot 24\text{ hr}$ 以下であることをいう。検出用シート状物1の使用時にはこのセパレーター4は剥離されるので、容易に剥離できるように、熱融解シールまたは接着シールによって凹部2のまわりの密着面側にセパレーター4が密着されていることが好ましい。この時、必要であれば、検出用試薬3の長期安定性を十分に確保するために、凹部2内は窒素等の不活性ガスで置換されていてもよい。

【0021】セパレーター4としては、熱融解シールまたは接着シールで、剥離可能なものであれば特に限定されず、例えば、ポリエチレンフィルム、ポリエチレンとアルミ箔、ポリエステル、ポリプロピレン、滅菌紙との積層体等が例示される。

【0022】本発明の微生物検出方法を、粘着シートを用いて被検物表面に付着している微生物を当該粘着シートの粘着面に転写・捕集して検査する場合を例にして説明する。例えば、図1～4に示すような検出用シート状

物1を使用し、先ずセパレーター4を剥離し、次いで一回の検出反応に必要な量の検出用試薬3が保持された凹部2に、当該検出用試薬3を溶解し得る、一回の検出反応に必要な量の溶解液を添加する。この場合、図5に示すように、一回の検出反応に必要な量の溶解液6を容器5に密封封入したものを使用し、使用直前にこれを開封してこの溶解液6を検出用シート状物1の凹部2内に全量を移入する方法を採用してもよい。この溶解液6としては、例えば、無菌水、緩衝液等が使用される。また、この容器5は、溶出性のないガラスまたはポリエチレンやポリプロピレンやPET樹脂等から製造された容器であり、溶融密封されている（例えば、アンプル）か、溶出性のない栓等で密封されていることが望ましい。

【0023】凹部2に溶解液6を添加した後、この凹部2を密閉するように、検出用シート状物1の密着面側と粘着シート（被検物表面に付着している微生物を転写・捕集したもの）とを液漏れが起こらないようぴったりと密着させる。次いでこれらをよく振とうして、凹部2中の検出用試薬3を溶解液6に十分に溶解させて検出用試液を調製しながら、同時に当該粘着シートに付着している検査対象物、即ち、細菌等の微生物に当該検出用試液を接触させる。なお、ここでは、上述したように、凹部2の密着面側の断面は、当該粘着シートの断面よりも小さいものが使用される。振とうは、手で振り動かしながら振とうしてもよいし、あるいは振とう機にセットして振とうしてもよいが、通常10秒から15分の間で適宜に選んでよく振とうする。

【0024】この時、微生物が有する微量成分と検出用試液とが十分に接触すると生化学的特異反応が生じる。検出用試薬3が酵素前駆体と発色性基質を含んでなる発色試薬である場合、微生物が有する微量成分と酵素前駆体との生化学的特異反応により生じる産物が発色性基質を発色させる。発色状態や発色量の観察は、そのまま肉眼によって目視判定してもよく、また光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、レーザー顕微鏡等の顕微鏡もしくは他の適当な光学機械を用いて光学画像を形成させ、この画像を統計的に解析することにより行ってもよい。尚、検出用試液と接触させる検査対象物には、粘着シートを用いて転写・捕集されたものだけでなく、例えば脱脂綿、カーゼ等により被検物表面から拭き取ったものや、例えば集塵機を用いて被検物表面から捕集されたもの等も含まれる。

【0025】検出用シート状物1の少なくとも凹部2の形成部分が透明または半透明であれば、検出用シート状物1側から観察できる。検査対象物が、後述するような、被検物表面に付着した微生物であって、これを粘着シートの粘着層表面に転写・捕集し、当該粘着シートで凹部2を密封して検出を行う場合には、この粘着シートが透明または半透明であると、当該粘着シート側からでも観察できる。このようにして、微生物の検出・定量が行われる。

【0026】ここで検査対象となる微生物には、細菌や放線菌等の原核微生物、酵母やカビ等の真菌類、下等藻類、ウイルス、動物性の培養細胞等が含まれる。

【0027】本発明で使用される検出用試薬3としては、発色試薬、蛍光試薬または発光試薬が挙げられる。このうち、蛍光試薬としては、例えば、特公昭61-54400号公報に記載の蛍光試薬が挙げられる。

【0028】本発明で使用される発色試薬としては、微生物の存在により発色する試薬であれば特に制限はないが、例えば、各種微生物の構成成分の存在下で発色する系に関与する試薬が挙げられる。各種微生物の構成成分としては、 β -1, 3-グルカン、ペプチドグリカン等の各種微生物の細胞壁構成成分や、エンドトキシン等の細胞表層中に存在する成分等がある。 β -1, 3-グルカンには免疫賦活作用があり、ペプチドグリカンには体液性免疫応答の増強効果、腫瘍壊死因子(TNF)誘導物質の効果を高める作用、細菌内毒素等の生物への影響を高める作用等があることも知られている。エンドトキシンは、主にグラム陰性菌の細胞表層中に存在するリポ多糖類の一種であり、発熱性物質(Pyrogen)として一般的によく知られている物質である。

【0029】検出において、標準物質として用いる β -1, 3-グルカンとしては、 β -1, 3結合を有するグルコースポリマーやその誘導体、例えば、サイモサン、カードラン、バキマン、スクレロタン、レンチナン、ジソフィラン、コリオラン、ラミナラン、リケナンおよびその誘導体が例示される。ペプチドグリカンとしては、特に限定されないが、例えば、各種細菌類（例えばMicrococcus属、Streptococcus属、Aureobacterium属、Bacillus属、Agrobacterium属等）の細胞壁細胞成分等が例示される。エンドトキシンとしては各種グラム陰性菌、例えばEscherichia、Salmonella、Klebsiella、Serratia、Shigella、Pseudomonas等のリポ多糖が例示される。

【0030】このような各種微生物の構成成分の存在下で発色する系に関与する試薬としては、①各種微生物の構成成分と反応する試薬と②当該反応による産物の作用により発色する発色性基質との組み合わせがある。

【0031】①各種微生物の構成成分と反応する試薬としては、節足動物（例えば昆虫、カブトガニ）の体液由来の物質が挙げられる。このうち、エンドトキシンと反応する物質としては、自体公知のエンドトキシン測定法、例えば、リムルステスト法等に用いられる試薬（例えばカブトガニの血球成分抽出液（以下、AL溶液ともいう））等が挙げられる。当該AL溶液としては、例えば、リムルス属(Limulus)、タキプレウス属(Tachypleus)あるいはカルシノスコピウス属(Carcinoscopius)に属するカブトガニの血球から抽出されたもので、エンドトキシンまたは β -1, 3-グルカンと反応する試薬であれば特に限定されない（例えば、特開昭54-611

28号公報、特開昭54-15797号公報、特開昭57-176940号公報に記載のものが例示される。また、例えばACC(Associates of Cape Cod)社、バイオウィタカー(BioWhittaker Inc.)社、エンドセイフ(Charles River Endosafe, Inc.)社、生化学工業(株)社および和光純薬工業(株)社等から市販されているAL溶液の凍結乾燥品をもとに調製したものも当然のことながら使用可能である。エンドトキシンをリムルステスト法を用いて検出する場合の手法は、通常採用される方法であれば特に限定はされない。

【0032】ペプチドグリカンおよび/または β -1, 3-グルカンと反応する試薬としては、例えば、昆虫の体液成分から調製されたペプチドグリカンおよび/または β -1, 3-グルカンと特異的に反応する試薬(例えば、SLP試薬セット、SLPシングル試薬セット(和光純薬工業(株)製))が挙げられる。

【0033】ペプチドグリカンと反応する試薬としては、例えば、昆虫の体液成分から調製されたペプチドグリカンと特異的に反応する試薬が挙げられる。

【0034】 β -1, 3-グルカンと反応する試薬としては、例えば、昆虫の体液成分から調製された β -1, 3-グルカンと特異的に反応する試薬や、例えばリムルス属(Limulus)、タキプレウス属(Tachypleus)あるいはカルシノスコピウス属(Carcinoscorpius)に属するカプトガニの血球から抽出されたもののうち、 β -1, 3-グルカンと反応するがエンドトキシンとは反応しない試薬が挙げられる。

【0035】これらの試薬は、市販品を使用してもよいし、また公知の方法により自製したものを使用してもよい。昆虫の体液成分から、ペプチドグリカンおよび/または β -1, 3-グルカンと反応する試薬を調製する方法としては、例えばペプチドグリカンと反応する試薬については特開昭63-141599号公報、 β -1, 3-グルカンと反応する試薬については特開昭63-141598号公報に開示の以下の方法が採用され得る。

【0036】即ち、当該試薬を調製するための昆虫としては特に制限はないが、なるべく大型のもので飼育方法が確立しているものが望ましく、例えばタバコスズメガ、カイロガ等の鱗翅類；センチニクバエ、イエバエ等の双翅類；トノサマバッタ、エンマコオロギ等の直翅類；センノキカミキリ等の甲虫類等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。体液としては体腔から得られるヘモリンパ(hemolymph)が最も得られやすくより一般的である。なお、昆虫類には、幼生、成体を問わず全ての態様のものが含まれる。鱗翅目、双翅目および鞘翅目等の完全変態類に属する昆虫については、取得の容易性から成虫よりも幼虫が好ましい。

【0037】上記の昆虫から体液を得る方法としては、例えば、昆虫を氷上に置いて動きを止めた後、トウキビ因子(サトウキビに含まれるグルコース、アミノ酸等か

らなる高分子物質)を不純物として含む蔗糖、またはトウキビ因子そのものを含む生理食塩水を体腔に注射し、その後しばらく放置して体腔よりヘモリンパを集めるといった方法等が挙げられる。得られたヘモリンパを遠心分離処理して血球を除き、その後透析して血漿を得る。この血漿中には、エンドトキシンとは反応しないが β -1, 3-グルカンと特異的に反応して酵素活性を発現する物質(或いは発現を誘因する物質)と、ペプチドグリカンと特異的に反応して酵素活性を発現する物質(或いは発現を誘因する物質)とが共存している。そのため、これはこのまま β -1, 3-グルカンおよび/またはペプチドグリカンと反応して発色する試薬として使用することができる。

【0038】また、この血漿から β -1, 3-グルカンと特異的に反応して酵素活性を発現する試薬を得る場合には、当該血漿中よりペプチドグリカンと反応して酵素活性を発現する物質(或いは発現を誘因する物質)を除去すればよい。反対にこの血漿からペプチドグリカンと特異的に反応して酵素活性を発現する試薬を得る場合には、当該血漿中より β -1, 3-グルカンと反応して酵素活性を発現する物質(或いは発現を誘因する物質)を除去すればよい。

【0039】上記血漿中から、 β -1, 3-グルカンまたはペプチドグリカンと反応して酵素活性を発現する物質(或いは発現を誘因する物質)を除去する方法としては、一般に生化学の分野で用いられている分離精製法が採用され得る。ペプチドグリカンと反応して酵素活性を発現する物質(或いは発現を誘因する物質)を除去する場合には、当該血漿にペプチドグリカンを結合させた担体をアフィニティークロマトグラフィーにより処理し、 β -1, 3-グルカンと反応して酵素活性を発現する物質(或いは発現を誘因する物質)を除去する場合には、当該血漿に β -1, 3-グルカンを結合させた担体をアフィニティークロマトグラフィーにより処理することにより、それぞれ極めて容易にかつ効率よく行うことができる。

【0040】上記の除去方法で使用される β -1, 3-グルカン、ペプチドグリカンとしては上記で例示したものが使用され得る。

【0041】本発明においては、各種微生物の構成成分と反応する試薬のうち、各種微生物の構成成分と反応して酵素活性を発現する物質あるいは酵素活性の発現を誘因する物質は、酵素前駆体カスケード中の物質である。酵素前駆体カスケードとしては、例えば、プロフェノール酸化酵素カスケード、プロ凝固酵素カスケードが例示される。中でも、好ましくは節足動物(例えば昆虫、カプトガニ)の体液由来のプロフェノール酸化酵素カスケードまたはプロ凝固酵素カスケードであり、より好ましくは昆虫(例えばカイコ)の体液由来のプロフェノール酸化酵素カスケードである。各種微生物の構成成分と酵

素前駆体カスケード中の物質とが反応すると、結果として、当該カスケード中に存在する不活性型因子である酵素前駆体が活性化されて酵素となり、そしてこの酵素の作用により発色性基質が発色する。

【0042】カイコの体液 (Silkworm Larvae Plasma) 中には、微生物細胞壁構成成分のペプチドグリカンおよび/または β -1, 3-グルカンと反応してプロフェノール酸化酵素を活性化させてフェノール酸化酵素を生成させるカスケード系が存在するので、当該フェノール酸化酵素の作用により発色する発色性基質と併用すると、フェノール酸化酵素活性が測定されて微生物を検出、計数することができる。具体的な試薬としては、カイコの体液を無菌的に採取調製した凍結乾燥品であるSLP試薬 (和光純薬工業 (株) 製) がある。プロフェノール酸化酵素カスケード中の物質を用いる場合、発色性基質としては3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)アラニン (以下、DOPAという。) 等が使用され得る。

【0043】SLP試薬中には、カイコ体液由来のヘモリンバ (完全な上記プロフェノール酸化酵素カスケード系を含む) が含まれており、プロフェノール酸化酵素カスケード中の物質とペプチドグリカンや β -1, 3-グルカンと微量高感度に反応し、結果としてプロフェノール酸化酵素が活性化されてフェノール酸化酵素となる。このフェノール酸化酵素が、発色性基質として加えられたDOPAを微量高感度に酸化してメラニン色素を形成させ、黒紫色に発色させる。従って、検査対象物である微生物量に応じて、SLP水溶液中のプロフェノール酸化酵素が活性化されてフェノール酸化酵素となり、その結果、その量に応じた濃度の黒紫色に発色することになる。

【0044】SLP試薬や発色性基質DOPAの量 (濃度) は、検査対象物である微生物の量に応じて適宜決められるが、当然のことながら微生物の量が多い (濃度が高い) ほど黒紫色への発色時間が短くなるし、微生物の量が少ない (濃度が低い) ほど発色時間が長くなる。また当然のことながら、検査対象物である微生物の量が多いと生成されたフェノール酸化酵素の量が多くなるので、黒紫色への発色時間を測定することにより、ほぼ正確に検査対象物である微生物の量を定量的に観測することができる。微生物の種類にもよるが、皮膚常在菌の表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) では、細菌量が多い場合 (10^4 個/ cm^2 以上) では2~20分で、細菌量が少ない場合 (10^1 個/ cm^2 以下) では30分以上で発色する。このとき、目視判定すれば細菌量のオーダーレベルでの存在を判断できる。また生成されるメラニン色素量を光学器械を用いて、検査対象物上を高感度高感度スキャンし、予め求められた検量線と対比させることにより、細菌量の定量測定もできる。

【0045】本発明の微生物検出方法によれば、コロニー形成のための培養等の手順を必要としないリアルタイム

の試験が可能となる。しかもひとつの被検物表面についての微生物検出の手順を本発明の検出方法で行えば、必要ならば30分以内で観測、判定できる。

【0046】本発明の微生物検出方法は、被検物そのものをそのまま検出試験に供してもよいし、被検物表面に付着した微生物を例えば粘着シートの粘着面に転写・捕集し、当該粘着シートの粘着面を検出試験に供してもよい。この場合、粘着シートとしては、例えば、図6に示されるような、粘着層8が支持体9上に層覆された粘着シート7等が挙げられる。このような粘着シートの使用方法としては、被検物表面に粘着シート7の粘着層8を圧着させて剥離することによりあるいはこの操作を数回繰り返すことにより、当該被検物表面に付着している微生物を粘着層8表面に転写・捕集する方法等が挙げられる。

【0047】具体的には、例えば、直接、手操作で床、壁、着衣、ベッドシート等の被検物に粘着シート7を圧着させるか、あるいは粘着シート7が巻かれたローラを、床、壁等の被検物に圧着して微生物を転写・捕集する。比較的微生物の少ないと考えられる被検物に圧着する場合は、粘着シート7の同一粘着層8表面で複数回圧着してもよい。このような転写・捕集方法によれば、多量に微生物を捕集できる。

【0048】このように、被検物表面に付着した微生物が転写・捕集された粘着シートの粘着層8表面を使用して本発明の微生物検出方法を行えば、アガースタンプ法とは異なり培養をする必要がないので、培養時における菌相の変化を懸念することなく、また、メンブレンフィルタ法のように、水に分散した微生物を濃縮するような手間がなく、圧着回数を増やすことにより、容易に多くの微生物を捕集することができることになる。

【0049】検出に際しては、この粘着シート7は、必要に応じて、所定の大きさに、即ち、検出用シート状物1の凹部2の密着面側の断面よりも大きくなるように切断される。そして、上述と同様に、凹部2を覆うように、検出用シート状物1の密着面とこの粘着シートの粘着層8表面とを液濡れが起こらないようぴったりと密着させ、次いでこれらをよく振とうして、凹部2中の検出用試薬3を溶解液6に充分に溶解させて検出用試薬を調製しながら、同時に粘着層8表面に付着している細菌等の微生物に当該検出用試薬を接触させる。

【0050】粘着シート7は、粘着層8表面に転写・捕集された微生物の検出反応を観察することができるように透明または半透明であることが好ましい。ここで、透明または半透明とは、粘着層表面の転写・捕集された微生物の検出反応を観察できる程度に透明であることをいう。透明または半透明でない場合、この検出反応を支持体9側から観察することができない。

【0051】粘着シート7の支持体9は、折り曲げに対して破壊しない十分な強度を持ち、粘着シート7として

曲面や狭所表面にも自在に圧着適用できる柔軟な支持体であり、粘着シート7が透明または半透明となるように自身も透明または半透明であることが好ましい。その材質は、このような条件を満足するものであれば特に限定されない。例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリエステルアミド、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリ塩化ビニル、ポリウレタン、エチレン酢酸ビニル共重合体、酢酸セルロース、ニトロセルロース等からなるプラスチックフィルムが好適に用いられる。支持体の厚みは、好ましくは50〜20000 μ m

【0052】粘着層8は、粘着性を有するとともに、粘着シート7が透明または半透明となるように自身も透明または半透明であることが好ましい。さらに、粘着層8表面の水濡れ接触角が90°以下であり、水に対して十分濡れ性が良いことが好ましい。本発明において水濡れ接触角とは、粘着層8表面と液滴とのなす角のうち液滴を含む側の角度をいう。この水濡れ接触角が90°を超えると水に対して十分濡れ性が劣り、この粘着層8表面に検出用試液を十分に接触させることができず、微高感度に微生物と検出用試液との生化学的特異反応を十分に起こさせることができない。この水濡れ接触角は、好ましくは30°以下、より好ましくは10°以下、特に好ましくは実質的に0°である。水濡れ接触角が実質的に0°であれば、粘着層8表面の水に対する濡れ性は完全であり、この粘着層8表面に検出用試液を十分に接触させることができ、微高感度に微生物と検出用試液との生化学的特異反応を十分に起こさせることができる。

【0053】本発明において、水濡れ接触角はFACE自動接触角計CA-X型（協和界面科学（株）製）にて測定したものである。その測定条件は次の通りである。
①液滴調整器：液滴法で液滴量を約0.9 μ lに調整する。

②温度：25℃

③測定時：液滴の滴下の30秒後

【0054】粘着層8に用いられる粘着剤としては、上述したような透明または半透明でかつ90°以下の水濡れ接触角を有する層を形成し得るものであれば、特に限定されないが、好ましくは水溶性高分子が挙げられる。水溶性高分子としては、寒天、カラゲニン、アラビアゴム、ゼラチン、カルボキシメチルセルロース等の水溶性天然高分子；ビニルピロリドン、ビニルアルコール、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-メトキシエチルアクリレート、ビニルエーテル、アクリル酸等の水溶性モノマーを一種もしくは二種以上重合してなる重合体が例示される。粘着層の水濡れ接触角が90°以下の範囲を逸脱しなければ、アクリル酸ブチルやアクリル酸-2-エチルヘキシル等の疎水性モノマーを共重合成分として使用した粘着性高分子や、親水性ポリエーテル系ウレタンポリマー、スチルバジウム化ポリビニルアルコー

ル、キサンタンガム等の多糖類ポリマーも例示される。

【0055】好ましい水溶性高分子として、アルコキシアルキルアクリレートとN-ビニルラクタムとのアクリル系共重合体が挙げられる。アルコキシアルキルアクリレートとしては、炭素数1〜4のアルコキシ基、および炭素数2〜4のアルキル基あるいはアルキレングリコール基とを有するアクリレートが好適に使用される。具体的には、例えば、2-メトキシエチルアクリレート、2-エトキシエチルアクリレート、2-ブトキシエチルアクリレート、3-メトキシプロピルアクリレート、3-メトキシブチルアクリレート、3-エトキシプロピルアクリレート、3-エトキシブチルアクリレート、ブトキシトリエチレングリコールアクリレート、2-（2-エトキシエチル）エチルアクリレート、メトキシトリエチレンアクリレート等、メトキシシプロピレングリコールアクリレート等の、アルコキシアルキルアクリレート類やアルコキシアルキルグリコールアクリレート類が挙げられ、親水性が高い等の点から、2-メトキシエチルアクリレート、2-エトキシエチルアクリレートが好ましい。

【0056】もう一方のモノマー成分であるN-ビニルラクタムとしては、5〜7員環のN-ビニルラクタムが好適に使用される。例えば、N-ビニル-2-ピロリドン、N-ビニル-2-ピペリドン、N-ビニル-2-カプロラクタム等が挙げられるが、安全性、汎用性の面からN-ビニル-2-ピロリドンが好ましい。

【0057】アルコキシアルキルアクリレートの配合割合は、アクリル系共重合体中、好ましくは60〜80重量%、より好ましくは65〜75重量%である。アルコキシアルキルアクリレートの配合割合が60重量%未満になると、粘着層は柔軟性が低く、またアクリル系共重合体が水分に溶解して流れが生じる場合があり、逆に80重量%を超えると粘着層は粘着性が亢進し、また粘着層の強度および吸水能力が低くなる場合がある。

【0058】また、N-ビニルラクタムの配合割合は、アクリル系共重合体中、好ましくは20〜40重量%、より好ましくは25〜35重量%である。N-ビニルラクタムの配合割合が20重量%未満になると、粘着層は粘着性が亢進し、また粘着層の強度および吸水能力が低くなる場合があり、逆に40重量%を超えると粘着層の柔軟性が低く、またアクリル系共重合体が水分に溶解して流れが生じる場合がある。

【0059】上記の水溶性高分子の製造は、それ自体既知の方法で行うことができる。例えば、アクリル系共重合体は、溶液重合、乳化重合、懸濁重合、熱状重合、光重合等のいずれの共重合方法で製造してもよい。

【0060】粘着層8には、さらに適度な粘着性を付与するために、親水性または水溶性の低分子物質を添加してもよい。親水性または水溶性の低分子物質としては、沸点が100〜400℃、好ましくは200〜350℃

19

20

30

40

50

の高沸点液状化合物が挙げられる。その具体例として、多価アルコール、糖アルコール等が挙げられ、多価アルコールとしては、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、液状ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1, 1, 1-トリヒドロキシプロパン、グリセリン等が挙げられ、糖アルコールとしてはソルビトールやソルビタン等が挙げられる。

【0061】グリセリンとエチレングリコールやプロピレングリコールとのエーテル型付加体であるポリオキシエチレングリセリルエーテルやポリオキシプロピレングリセリルエーテルでもよい。またソルビトールやソルビタンとエチレングリコールやプロピレングリコールとのエーテル型付加体であるポリオキシエチレンソルビタンエーテルやポリオキシプロピレンソルビタンエーテルでもよい。これらの親水性または水溶性の低分子物質の配合量は、粘着剤に対して好ましくは5~90重量%である。

【0062】また、粘着層8は、粘着層表面の水濡れ接触角が損なわれない範囲内で、粘着層全体が架橋されていて、該粘着層を構成する成分のうち好ましくは5~75重量%が水によって溶解、溶出されないゲル状不溶体を構成していてもよい。架橋されていないと、使用する水溶性高分子の種類によっては、被検物に粘着シート7の粘着層8を圧着させて剥離する際に、粘着層8が凝集破壊して正確な微生物の転写・捕集等を行えない場合がある。

【0063】粘着層8の架橋方法としては、架橋剤の添加による方法が挙げられる。架橋剤としては、エチレングリコールジグリシジルエーテル、グリセリントリグリシジルエーテル、トリグリシジルイソシアヌレート等の多価エポキシ化合物、コロネートLやコロネートHL（日本ポリウレタン社製）等の多価イソシアネート化合物が用いられる。これらの架橋剤の添加量は、粘着剤100重量部に対して通常0.01~5重量部の範囲で選ばれる。

【0064】粘着層8の他の架橋方法としては、例えば、電子線またはγ線等の放射線照射架橋による不溶化が挙げられる。この場合の放射線の照射線量は、例えば、粘着剤がアクリル系共重合体であれば、1kGy以上、特に25kGy~50kGyが好ましい。照射線量が25kGy以上の場合には、医療関連法規の定める滅菌を兼ねることができる。50kGyを超えると、粘着層8の劣化変化が著しく、好ましくない。

【0065】粘着層8は、ベークライト板に対して好ましくは30~600g/12mm幅、より好ましくは80~400g/12mm幅の剥離粘着力を有するように設計される。粘着力が30g/12mm幅未満では、被検物に粘着シート7の粘着層8を圧着させて微生物を転写・捕集する場合に、十分な微生物の回収率が得られ

ず、逆に600g/12mm幅を超える場合には、被検物に粘着シート7の粘着層8を圧着させて剥離する際に、粘着層8が凝集破壊してしまって正確な転写・捕集等を行えない場合がある。

【0066】粘着層8の厚さは、10~100μm、好ましくは20~80μm、より好ましくは30~60μmに設計する。厚さが10μm未満では、所要の剥離粘着力が得られなく、100μmを超えると、剥離する際に粘着層8が凝集破壊し易くなるからである。

【0067】検出用試薬が例えば酵素前駆体と発色性基質とから構成される場合、粘着層8中には発色性基質が含まれていてもよく、この場合には、検出用シート状物1の凹部2には発色性基質を保持させる必要はない。

【0068】粘着シート7は自体既知の方法で製造される。例えば、水溶性高分子および親水性または水溶性の低分子物質とを含有する水溶液を、透明または半透明の支持体9上に塗布し、10℃~20℃で乾燥させることによって製造される。

【0069】粘着剤がアクリル系共重合体の場合は、優れた熱可塑性を有するために、押出し成形によりシート状またはフィルム状に加工することができる。この押出し成形は、インフレーション成形、Tダイ成形、ラミネーション成形等の従来公知の方法を採用することができる。尚、押出し機は単軸押出し機および二軸押出し機のいずれを用いてもよい。成形温度、ダイリップ幅、押出し速度、引取り速度等の成形条件を適宜に制御することにより、フィルムあるいはシートの厚さを調整することができる。この場合、成形温度は140℃~180℃が好ましく、より好ましくは150℃~170℃である。成形法として、カレンダー法、キャスト法等の方法を用いることもできる。このように加工された粘着層8は支持体9上に積層される。

【0070】このようにして得られた粘着シート7は、電子線またはγ線等の放射線を照射することにより、架橋を施すこともできる。特に、粘着剤がアクリル系共重合体である場合はこの放射線架橋が有効である。架橋処理は前述と同様の条件で行うことができる。また、架橋剤を使用する場合には、加熱処理等により架橋反応をさせる。

【0071】また粘着シート7は、滅菌した状態で微生物遮断性包材に封入する等により、無菌状態を保持した形態をとることができる。なお滅菌法はEOG（エチレンオキシドガス）法、電子線法、γ線法を用いるのが好ましい。この場合、電子線またはγ線等の放射線の照射量はポリマーの親水度によって異なるが、架橋処理と同様の条件で行うことができる。

【0072】

【実施例】以下、本発明を実施例および比較例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0073】実施例1

攪拌機付き密閉型反応器に2-メトキシエチルアクリレート70重量部、N-ビニル-2-ピロリドン30重量部、重合開始剤としてアゾビスイソブチロニトリル0.175重量部および蒸留水；メタノール；イソプロパノール混合溶剤（重量比16：23：1）250重量部を仕込み、反応器内を窒素置換した後、反応器内の温度を60℃～62℃に維持しながら1.5時間攪拌した。続いて、75℃で2時間攪拌することにより反応を完結させた後、室温まで冷却して、アクリル系共重合体の溶液を得た。

【0074】このアクリル系共重合体の溶液に、アクリル系共重合体の固形分100重量部に対してポリオキシプロピレングリセリルエーテル（平均分子量400）20重量部を添加した。このアクリル系共重合体を含む溶液を、支持体9である、無色透明で、かつ折り曲げに強く柔軟なポリエステルフィルム（厚さ20μm）上に一定の厚さで塗布した後、130℃で10分間乾燥させて、粘着層8の厚さが50μmの無色透明の粘着シート7を2枚作成した。得られた粘着シート7の粘着層8表面に、蒸留水の水滴（0.9μl）を滴下して30秒後25℃における初期接触角を測定したところ実質的に0度であり、水に対して粘着面は完全濡れ性であることを確認した。なお、接触角の測定には、FACE自動接触角計CA-X型（協和界面科学（株）製）を用いた。またこの粘着シート7のベークライト板に対する粘着力は180g/12mm幅であった。

【0075】これとは別に、水蒸気不透過性の無色透明のポリエチレンテフタレートフィルム（厚さ0.1mm）に、深さ0.2mmで直径12mmの円形板にブリスター加工して凹部2を有する検出用シート状物1を作成した。この凹部2に、検出用試薬3として、固形微粒子状のSLP試薬1.1mg（3ml用の百分の一相当）と固形微粒子状のDOPA0.2mg（3ml用の百分の一相当）をそれぞれ精秤して窒素気流中で封入した。このとき凹部2を覆うセパレーター4として、剥離可能で、水蒸気不透過性のPET製フィルムにポリエチレンフィルムを積層したシートを用い、凹部2のまわりの密着面を熱溶融シールにて密着させた。

【0076】またこれとは別に、ガラス製の細管アンプル5に検出用試薬3の溶解液である無菌水6を30μlを精秤して溶解封入した。上記の粘着シート7を直径25mmの円形に切り抜いたものを2枚用意し、そのうちの1枚についてヒトの顔面皮膚の同一部位に粘着層8表面を3回圧着させて微生物検出用サンプルを作成した。一方、同時に上記の検出用試薬3の封入された凹部2のセパレーター4を剥がして、細管アンプル5の溶解液6を移入したのち、上記の粘着層8表面を内側にして凹部2を完全に覆う形で、検出用シート状物1の密着面に、振とう際に液漏れがおこらぬように密着させてデバイス

を作成した。このデバイスを室温下で45秒間よく振とうした後、室温空気環境下で保存しながら、検出用シート状物1側および/または粘着シート7側から凹部2を観察したところ、約7分で黒紫色の発色が見られた。

【0077】一方、ブランク試験用サンプルとして、直径25mmの円形に切り抜いたもう1枚の粘着シート7について、ヒトの顔面皮膚に圧着させなかったことを除いた以外は、上記とまったく同様にして、試験をおこなった。その結果、このサンプルにおいては約50分後に黒紫色に発色するのを確認した。

【0078】防菌防黴、Vol.22(No.3)、13-18(1994)によれば、ヒトの顔面皮膚には表皮ブドウ球菌を含めて $10^4 \sim 10^5$ 個/cm² レベルの細菌や微生物が存在することがわかっている。

【0079】実施例2

実施例1において、ポリオキシプロピレングリセリルエーテルの添加量を30重量部としたこと以外は、実施例1と全く同様にしてアクリル系共重合体を含む溶液を得た。このアクリル系共重合体の溶液を、支持体9としての無色透明のPETフィルム（厚さ10μm）上に一定の厚さで塗布した後、130℃で10分間乾燥することにより、厚さが40μmの粘着層8が片面に形成された粘着シート7を得た。この粘着シート7を滅菌状態が維持できる適当な袋に入れて、35kGy量のγ線に曝すことにより完全滅菌すると同時に、粘着層8にγ線架橋を起こさせた。この粘着シート7のベークライト板に対する粘着力は110g/12mm幅であった。

【0080】得られた粘着シート7を直径25mmの円形に打ち抜いたものを、十分な量の蒸留水に2時間浸漬することにより、粘着層8の架橋度を水に不溶化したゲル分率として測定した。この結果、粘着層8のゲル分率は52%であることが確認できた。また、この粘着シート7の粘着層8表面の蒸留水に対する初期接触角は、実施例1と同様に測定したところ実質的に0度であり、水に対して粘着面は完全濡れ性であることを確認した。

【0081】この粘着シート7について、実施例1と全く同様の操作で、その粘着層8表面をヒト顔面皮膚に3回圧着させて微生物検出用サンプルを作成した。このサンプルの粘着層8表面と、顔面皮膚に圧着していないそのまの粘着層8表面（ブランク試験用サンプル）とを、実施例1と全く同様の操作手順でそれぞれ発色させた。次いで、それぞれ光学機器を用いて、予め別に定置して得られた検量線と比較することにより、ヒト皮膚の表皮ブドウ球菌としての微生物量を測定した。その結果、ブランク用サンプルは 7.6×10^4 個/cm²、ヒト顔面皮膚に圧着させた方のサンプルは 1.2×10^5 個/cm² と測定された。

【0082】実施例3

市販のポリアクリル酸重合体水溶液（固形分濃度20%、日本純薬（株）製、商品名ジュリアーAC10H）

100.5gを水84gに溶解し、この溶解液に、平均分子量の異なるポリアクリル酸粉末（日本純業（株）製、商品名ジュリマーAC-10LP）86gとグリセリン217gを加熱しつつ加えて溶解させた。次いでNaOH35gを追加混合し、約60gモル%のケン化度のポリアクリル酸ソーダ/グリセリン混合水溶液を得た。

【0083】このポリアクリル酸ソーダ/グリセリン混合水溶液100重量部に対して、反応型架橋剤としてトリグリシジルイソシアヌレート0.34重量部を水に溶解して添加し、ポリアクリル酸ソーダの濃度が20重量%の粘性のある水溶液を得た。支持体9として、厚さ30μmの透明ポリプロピレンフィルムを用い、この片面に、粘着層8の固着性を向上させるようにコロナ放電処理した。この処理面側に、上記の粘性のある水溶液をファウンテンコータを用いて一定の厚さに塗布した。100℃で10分間乾燥炉にて乾燥させて連続的に巻き取った後、50℃で10時間加熱、成熟することにより無色透明の粘着シート7を得た。粘着層8の厚さは50μmであり、ベークライト板に対する粘着力は200g/12mm幅であった。

【0084】得られた粘着シート7を直径25mmの円形に打ち抜き、実施例2と同様の手順で粘着層8の架橋度合いを水不溶化ゲル分率として測定したところ、48%であることが確認できた。また、この粘着シート2の粘着層8表面の蒸留水に対する初期接触角は、実施例1と同様に測定したところ実質的に0度であり、水に対して粘着層8表面は完全濡れ性であることを確認した。

【0085】これとは別に、PETフィルム上に大腸菌 1×10^8 個/cm²の表面濃度で菌を形成させた標本を作成した。またブランク標本として大腸菌を形成させていないPETフィルムを用意した。上述の粘着シート7の粘着層8表面を上記の大腸菌の形成されている標本の同一部位に2回圧着させて微生物検出用サンプルを作成した。他方、上述の粘着シート7の粘着層8表面を上記の大腸菌の形成されていない標本の同一部位に2回圧着させて微生物検出用サンプルを作成した。この2つのサンプルについて、実施例1と全く同様の操作を行い、発色を観察した。

【0086】大腸菌を形成させた標本の面に圧着させたサンプルについては約8分後に、またブランク標本の面に圧着させたサンプルについては約1時間後に、それぞれ黒紫色の発色を観察した。

【0087】この結果から容易に判断できるように、肉眼による目視判定で黒紫色の発色時間を観察することにより、細菌の存否を判定することができる。なお、本実施例の結果からも分かるように、この場合ブランク標本においても時間の経過に伴い、黒紫色の発色が観察されたことから、常態環境下におけるブランク標本において、細菌こそないものの、細菌等の微生物の数はゼロ

ではなかった。

【0088】実施例4

攪拌機付き密閉型反応器にブチルアクリレート95重量部、アクリル酸5重量部、重合開始剤としてアゾビスイソブチロニトリル0.175重量部および酢酸エチル250重量部を仕込み、反応器内を窒素置換した後、反応器内の温度を60℃～62℃に維持しながら1.5時間攪拌した。続いて、75℃で2時間攪拌することにより反応を完結させた後、室温まで冷却して、アクリル系共重合体の粘度稠な溶液を得た。

【0089】この粘稠な溶液100重量部に対して、ベンゾイルパーオキサイド0.2重量部を加えて25℃で15分間よく攪拌して溶解させた。支持体9として、厚さ10μmの透明PETフィルムの片面をコロナ電気放電処理したフィルムを使用した。このフィルムのコロナ処理側に上記の粘稠な溶液をファウンテンコータを用いて一定の厚さに塗布した後、110℃で10分間乾燥炉にて乾燥させて、粘着層8の厚さが50μmの無色透明の粘着シート7を得た。なおベークライト板に対する粘着層の粘着力は450g/12mm幅であった。得られた粘着シートを直径25mmの円形に打ち抜いたものを十分な量のトルエンに2時間浸漬することにより、粘着層8の架橋度合いをトルエンに不溶化したゲル分率として測定した。この結果、粘着層8のゲル分率は58%であることが確認できた。また、この粘着シート7の粘着層8表面の蒸留水に対する初期接触角は、実施例1と同様に測定したところ83°であり、水に対して粘着層8表面は中程度の濡れ性であることを確認した。

【0090】これとは別に、PETフィルム上に大腸菌 1×10^8 個/cm²の表面濃度で菌を形成させた標本を作成した。またブランク標本として無菌状態のPETフィルムを用意した。上述の粘着シート7の粘着層8表面を上記の大腸菌の形成されている標本の同一部位に1回圧着させて微生物検出用サンプルを作成した。他方、上述の粘着シート7の粘着層8表面を上記の大腸菌の形成されていない標本の同一部位に1回圧着させて微生物検出用サンプルを作成した。この2つのサンプルについて、実施例1と全く同様の操作を行い、発色を観察した。

【0091】大腸菌を形成させた標本に圧着させたサンプルについては、9分後に黒紫色の発色を観察した。一方、ブランク検体に圧着させたサンプルについては約3時間後においても黒紫色の発色は観察されなかった。

【0092】この結果から容易に判断できるように、肉眼による目視判定で黒紫色の発色時間を観察することにより、細菌の存否を判定することができる。

【0093】

【発明の効果】本発明によれば、酵素前駆体と微生物の構成成分との生化学的特異反応と酵素反応とを組み合わせた、微生物の高感度かつ高精度の検出または計測を行

うことができる。当該方法は、微生物培養を伴わずに、簡便に、リアルタイムでの微生物試験が可能となる。また、検出対象が生菌のみに限定されない。また、粘着テープを使用して、被検物表面に付着する微生物を容易により多く集積することができる。また、酵素前駆体を適宜選択することにより、特定の微生物のみを検出、計数できる。従って、医療、食品等の現場での環境調査に適用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の検出用シート状物の一例の横断面図である。

【図2】本発明の検出用シート状物の一例の横断面図である。

【図3】本発明の検出用シート状物の一例の横断面図である。

【図4】本発明の検出用シート状物の一例の横断面図で*

*ある。

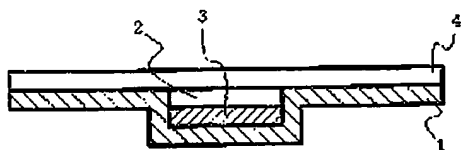
【図5】本発明で使用する溶解液を密封封入した容器の一例である。

【図6】本発明で使用する粘着シートの一例の横断面図である。

【符号の説明】

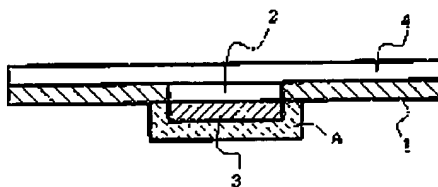
- 1 検出用シート状物
- 2 凹部
- 3 検出用試薬
- 4 セパレーター
- 5 容器
- 6 溶解液
- 7 粘着シート
- 8 粘着層
- 9 支持体
- A 透明または半透明

【図1】

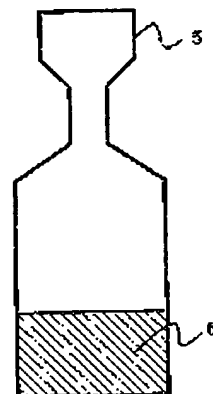


- 1 検出用シート状物
- 2 凹部
- 3 検出用試薬
- 4 セパレーター

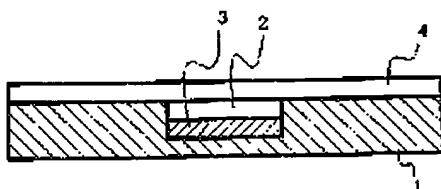
【図2】



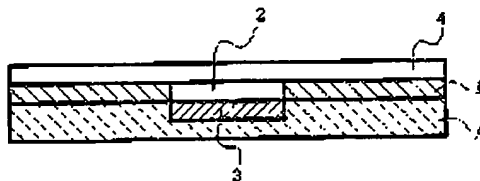
【図5】



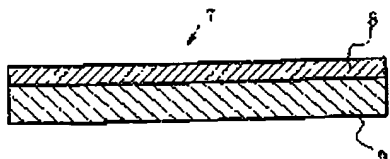
【図3】



【図4】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 土谷 正和
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工
業株式会社大阪研究所内

(72)発明者 那須 正夫
大阪府吹田市山田丘1-6 大阪大学薬学
部内
(72)発明者 谷 佳徳裕
大阪府吹田市山田丘1-6 大阪大学薬学
部内